

Konsentrasi Hambat Minimal dan Konsentrasi Bunuh Minimal Ekstrak Buah Delima Merah (*Punica granatum linn*) terhadap Bakteri *Enterococcus faecalis*

Minimum Inhibitori Concentration and Minimum Baktericidal Concentration of Pomegranate (Punica Granatum Linn) against Enterococcus Faecalis

Aryo Dwipo Kusumo¹, Nanik Zubaidah², Tamara Yuanita²

¹Mahasiswa Strata-1 Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

²Staf Pengajar Departemen Konservasi, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

ABSTRACT

Background. Elimination of pathogenic bacteria on the teeth with infected pulp is one of the goals of root canal treatment, but in clinical studies, either through mechanical instrumentation and irrigation canals, pathogenic bacteria can still be found. *E.faecalis* has been widely identified as the species most commonly found in retreatment root canal treatment in cases of persistent infection. The bacteria *E.faecalis* was the most resistant bacteria in root canals. Sterilization and irrigation are the elimination stages of root canal treatment. But until present, synthetic materials that used as irrigation and sterilization in root canal treatment still have many side effects. Back to nature, there is alternative material, such as pomegranate, which has active compounds like flavonoids, tannins, and alkaloids that potential for antibacterial agent. **Purpose.** The purpose of this study was to determine the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Bactericidal Concentration (MBC) of pomegranate fruit extract (*Punica granatum linn*) against *E.faecalis*. **Methods.** This study was a laboratory experimental study. Pomegranate extract used is red pomegranate extracted by maceration method and performed serial dilution to obtain various concentrations. Value of MIC and MBC pomegranate's extract on *E.faecalis* were done by calculating the bacteria in Blood agar media. Growth of bacteria colonies was calculated manually in colony forming unit (CFU). **Results.** Red pomegranate fruit extract had MIC at concentrations of 25% and 50% of MBC against *E.faecalis*. **Conclusion.** MIC and MBC of red pomegranate fruit extract (*Punica granatum Linn*) against *E.faecalis* bacteria are each at concentration of 25% and 50%. **Keywords:** red pomegranate extract, tannins, flavonoids, alkaloids, *Enterococcus faecalis*.

Korespondensi (correspondence): Aryo Dwipo Kusumo, Bagian Konservasi, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, Jl. Mayjend Prof. Dr. Moestopo No. 47 Surabaya 60132, Indonesia. E-mail: aryo.dk.dunk@gmail.com

PENDAHULUAN

Infeksi endodontik umumnya disebabkan oleh mikroorganisme yang menginfiltrasi ruang pulpa yang steril dan jaringan periapikal. *Enterococcus faecalis* adalah bakteri kokus fakultatif anaerob Gram positif yang bersifat patogen oportunistik yang sering menjadi penyebab periodontitis marginalis, infeksi saluran akar dan abses periradikuler. Hal ini berhubungan

dengan kegagalan perawatan saluran akar yang banyak ditemukan secara signifikan.¹

Enterococcus faecalis dan jamur, terutama *C. Albicans* teridentifikasi sebagai mikroorganisme yang paling banyak ditemukan pada *retreatment* dalam kasus kegagalan terapi endodontik dan saluran akar dengan infeksi persisten.² Bakteri *Enterococcus faecalis* adalah bakteri yang paling resisten pada saluran akar dan merupakan salah satu penyebab dari kekambuhan penyakit *post* perawatan endodontik.³

Enterococcus faecalis mampu bertahan dari bahan kimia termasuk kalsium hidroksid.⁴ Kalsium hidroksid mempunyai aksi kerja melalui pelepasan ion Ca^{2+} yang berperan dalam proses mineralisasi jaringan dan ion OH^- yang dapat memberikan efek antimikroba melalui peningkatan pH sehingga terbentuk lingkungan alkali yang tinggi yang tidak sesuai bagi perkembangan mikroorganisme. Kekurangan yang dimiliki kalsium hidroksida yaitu diantaranya efektifitas antibakteri kalsium hidroksida untuk membunuh bakteri dengan peningkatan pH membutuhkan waktu yang lama karena kelarutan dan kemampuan difusi kalsium hidroksida yang rendah, jaringan nekrosis di dalam ramifikasi, ismus, dan kelainan anatomi gigi dapat menurunkan efektifitas antibakteri kalsium hidroksida, selain itu *Enterococcus faecalis* mampu berkolonisasi di dalam tubuli dentin dan menghindari ion hidroksil dari kalsium hidroksida, kekurangan lain yang dimiliki kalsium hidroksida adalah karena kalsium hidroksida dapat meningkatkan adhesi dari bakteri dengan kolagen (komponen organik utama dari dentin) sehingga memperluas invasi bakteri ke dalam tubuli dentin dan menyebabkan peningkatan resistensi bakteri terhadap desinfektan.⁵

Penggunaan tanaman sebagai pengobatan telah lama dilakukan manusia, banyak tanaman yang telah digunakan sebagai bahan obat tradisional. Penggunaan sebagai penawar penyakit telah banyak dibuktikan dengan membandingkan terhadap masalah yang timbul akibat penggunaan antibiotik sintetis. Buah dari beberapa tanaman seperti buah delima (*punica granatum*) yang memiliki sifat antibakteri, merupakan *true antibiotics*, dikarenakan tanpa adanya efek samping, manfaat yang penting adalah adanya sifat bakterisid dan bakteriostatik pada bakteri patogen yang telah resisten terhadap antibiotik sintetis.⁶

Waage (1999) melakukan penelitian yang menemukan bahwa tanin yang merupakan salah kandungan utama dari buah delima merah mampu mengisolasi *S. Aureus* (44,3%), *Streptococcus sp.* (18%), *Staphylococcus sp.* (12,8%).⁷ Penelitian lain yang telah dilakukan yaitu mengenai uji antibakteri pada ekstrak dari kulit buah delima putih, berdasarkan penelitian tersebut, ekstrak kulit buah delima putih (*Punica granatum linn*) memiliki daya antibakteri terhadap *Streptococcus viridans* pada konsentrasi 25%,⁸ *Streptococcus mutans* pada konsentrasi 12,5%,⁹ dan 25% pada *Enterococcus faecalis*.¹⁰

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) dan

Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM) ekstrak buah delima merah (*Punica granatum linn*) terhadap *Enterococcus faecalis*. Zat-zat yang terkandung di dalam ekstrak delima merah memiliki potensi untuk dapat dikembangkan sebagai bahan irigasi saluran akar yang bersifat bakteriostatik maupun bakteriosid. Tanin merupakan basis aktivitas antibakterial dengan merusak membran sel yang menyebabkan kebocoran intraselular, flavonoid memiliki efek antibakteri karena kemampuannya berinteraksi dengan DNA bakteri, dan alkaloid mampu mengganggu komponen penyusun peptidoglikan, sehingga dinding sel bakteri tidak terbentuk utuh.^{11, 12} Berdasar berbagai sumber dan penelitian sebelumnya, belum ada penelitian tentang konsentrasi hambat minimal dan konsentrasi bunuh minimal ekstrak delima merah (*Punica granatum linn*) terhadap *Enterococcus faecalis*.

BAHAN DAN METODE

Jenis penelitian eksperimental laboratorium dengan rancangan penelitian: *the post test only control group design*. Lokasi penelitian di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu ekstrak delima merah (*punica granatum linn*) yang telah dilakukan identifikasi di Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya - Jawa Timur, bakteri *Enterococcus faecalis*, akuades steril, media Blood agar, dan media BHIB (*Brain Heart Infusion Broth*). Bakteri *Enterococcus faecalis* yang digunakan adalah bakteri *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (*American Type Culture Collection*) yang dibiakkan dalam media BHIB dan distandarkan dengan *suspense* 0,5 Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ sel/ml). Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah rak dan tabung reaksi, *petridish* (cawan petri), spuit, mikro pipet, gelas obyek steril, *spreader*, spidol, korek api, osse, *anaerobic jar*, spiritus brander, dan inkubator.

Buah delima merah didapatkan dari kota Surabaya. Ekstraksi delima merah dilakukan dengan metode maserasi dengan etanol 70%. Konsentrasi ekstrak delima merah yang digunakan dalam penelitian ini yaitu dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,13%, 1,565%, 0,781%. Jumlah replikasi masing-masing konsentrasi uji sebanyak 7 kali.

Pengujian daya anti bakteri ekstrak delima merah terhadap bakteri *enterococcus faecalis* dalam penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode penipisan seri/dilusi.

Metode dilusi dilakukan dengan cara mempersiapkan 10 tabung steril yang telah diberi media BHIB sebanyak 5 ml, kemudian memasukkan ekstrak delima merah dengan konsentrasi 100 % pada tabung 1 sebanyak 5 ml. Mengambil 5 ml dari tabung no 1 kemudian memasukkannya ke dalam tabung 2 hingga mencapai volume 10 ml. Penipisan dari tabung dua adalah 5/10 sehingga didapatkan ekstrak delima merah dengan konsentrasi 50%. Selanjutnya dari tabung 2 diambil 5 ml kemudian dimasukkan ke dalam tabung 3 sehingga penipisannya $\frac{1}{4}$ dan didapatkan konsentrasi 25%, dengan cara yang sama dilakukan sampai tabung 8, dan 5 ml dari tabung 8 dibuang. Tabung 9 sebagai kontrol positif (+) yang berisi media BHIB dan bakteri *Enterococcus faecalis*. Tabung 10 sebagai kontrol negatif (-) yang berisi media BHIB. Setelah itu dimasukkan 0,1 ml inokulum bakteri *Enterococcus faecalis* pada tabung 1 sampai 9. Kemudian setiap tabung diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Pembacaan hasil penipisan seri dari ekstrak delima merah terhadap pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis* dilakukan secara visual ada tidaknya pertumbuhan yang ditandai dengan kekeruhan atau endapan. Mengambil 0,1 ml dari tabung batas pertumbuhan bakteri yang dicurigai sebagai KHM serta satu konsentrasi dibawah dan diatasnya dan juga kontrol positif, kemudian ditanamkan pada media *Blood agar*. Inkubasi kembali dilakukan pada media *Blood Agar* pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah itu dilakukan *cross check* dengan perhitungan koloni dari setiap konsentrasi.

Konsentrasi hambat minimal (KHM) dan konsentrasi bunuh minimal (KBM) ditentukan dengan cara menghitung jumlah koloni yang tumbuh pada media *Blood agar* secara manual yang dinyatakan dengan *colony forming unit* (CFU) dan dibandingkan dengan kontrol positifnya. Perhitungan tersebut diulang tiga kali oleh tiga pengamat yang berbeda. Kontrol positif dibuat dengan media *Blood agar* yang ditambah dengan 0,1 ml suspensi bakteri uji tanpa penambahan ekstrak delima merah. Kontrol negatif dibuat dengan media *Blood agar* tanpa penambahan bakteri uji dan ekstrak delima merah.

Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) adalah konsentrasi terendah ekstrak delima merah yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri uji sebanyak 90% dari jumlah bakteri yang berhasil tumbuh pada kontrol positif. Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM) adalah konsentrasi terendah ekstrak delima merah yang dapat membunuh bakteri uji sebanyak 99,9% dari jumlah bakteri yang berhasil tumbuh pada kontrol.¹³

HASIL

Hasil hitung koloni pada media blood agar menunjukkan bahwa pada konsentrasi 25% didapatkan pertumbuhan bakteri 9,2% dan pada konsentrasi 50% tidak menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri uji (tabel 1). Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi 25% merupakan KHM dan konsentrasi 50% merupakan KBM ekstrak buah delima merah terhadap bakteri *Enterococcus faecalis*

Tabel 1. Rerata jumlah koloni bakteri *Enterococcus faecalis*

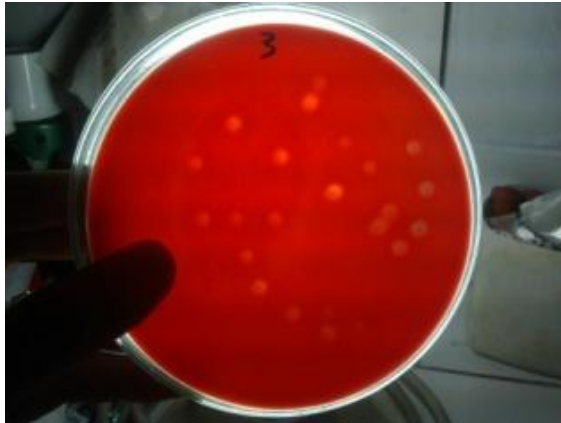
pada berbagai konsentrasi uji									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Kelompok				jumlah koloni				jumlah koloni (%)	
Perlakuan				N				(x10 ⁸ CFU/ ml)	
Kontrol (+)				7	217,43				100
Kontrol (-)				7	0				0
Konsentrasi 50%				7	0				0
Konsentrasi 25%				7	20,00				9,2
Konsentrasi 12,5%				7	60,43				27,8



Gambar 1. Penipisan seri ekstrak buah delima merah terhadap *Enterococcus faecalis*

Keterangan :

Tabung 1 : ekstrak buah delima merah konsentrasi 100%
 Tabung 2 : ekstrak buah delima merah konsentrasi 50%;
 Tabung 3 : ekstrak buah delima merah konsentrasi 25%;
 Tabung 4 : ekstrak buah delima merah konsen trasi 12,5%;
 Tabung 5 : ekstrak buah delima merah konsentrasi 6,25%;
 Tabung 6 : ekstrak buah delima merah konsentrasi 3,125%;
 Tabung 7 : ekstrak buah delima merah konsentrasi 1,565%;
 Tabung 8 : ekstrak buah delima merah konsentrasi 0,781%;
 Tabung 9 : Kontrol positif (+); Tabung 10: Kontrol negatif (-)



Gambar 2. Pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis* pada media *Blood Agar* dengan ekstrak delima merah konsentrasi 25%.

Hasil uji statistik Kolmogorov-Smirnov menunjukkan bahwa data pada kelompok positif, konsentrasi 12,5%, dan konsentrasi 25% memiliki nilai signifikansi 0,2 ($> 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa distribusi data-data tersebut normal, sedangkan pada uji statistik Levene, didapatkan nilai signifikansi 0,00 ($< 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa ketiga kelompok tersebut mempunyai varian yang tidak homogen, untuk itu perlu dilakukan tes alternatif non-parametrik Kruskal-Wallis dengan tes *post-hoc* menggunakan tes Mann-Whitney.

Tabel 2. Nilai signifikansi hasil uji *Kolmogorov Smirnov Test*, *Levene's Test*, dan *Kruskal-Wallis Test* pada semua kelompok

Kelompok	Kolmogorov Smirnov Test	Levene's Test	Kruskal-Wallis
Kontrol +	P = 0,200	P = 0,000	P = 0,000
Tabung 3 (12,5%)			
Tabung 2 (25%)			

Melalui tes Kruskal-Wallis dapat diketahui bahwa terdapat perbedaan yang bermakna pada jumlah koloni yang tumbuh pada kelompok penelitian yang dibuktikan dengan angka signifikansi sebesar 0,00 ($< 0,05$), sedangkan dari hasil tes Mann-Whitney ditemukan bahwa tiap kelompok memiliki signifikansi sebesar 0,002 ($< 0,05$) yang berarti terdapat perbedaan bermakna antar kelompok yang diujikan.

Tabel 3. Nilai signifikansi hasil uji *Mann Whitney Test*

	Kontrol positif (+)	12,5%	25 %
Kontrol positif (+)	-	0.002	0.002
12,5%	0.002	-	0.002
25 %	0.002	0,002	-

PEMBAHASAN

Faktor penyebab terbanyak dari kegagalan perawatan saluran akar adalah adanya mikroorganisme yang masih mampu bertahan hidup di saluran akar.¹⁴ Berbeda dengan infeksi endodontik primer yang banyak disebabkan karena infeksi dari bakteri batang Gram negatif, namun pada infeksi endodontik sekunder disebabkan karena satu atau lebih spesies bakteri.^{15,16,17,18,19} *Enterococcus faecalis* adalah salah satu bakteri yang paling resisten yang mampu bertahan di dalam saluran akar walaupun telah dilakukan prosedur perawatan saluran akar. Walaupun bakteri ini sering ditemukan dalam jumlah yang sedikit di dalam saluran akar, namun presentase penyebab kegagalan perawatan saluran akar yang disebabkan karena bakteri ini sangat tinggi.¹⁹

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak buah delima merah (*punica granatum linn*) memiliki daya antibakteri terhadap bakteri *Enterococcus faecalis*. Hal ini dibuktikan dengan adanya konsentrasi hambat minimal dan konsentrasi bunuh minimal. Berdasarkan dari hasil hitung koloni menunjukkan bahwa pada konsentrasi 50% tidak terdapat pertumbuhan koloni, sehingga sesuai dengan persyaratan konsentrasi bunuh minimal yaitu mampu membunuh bakteri sebesar 99,9% dari total rata-rata bakteri yang berhasil tumbuh pada kontrol positif, sedangkan pada konsentrasi 25% masih

terdapat pertumbuhan bakteri dengan adanya koloni pada media *blood agar* sebesar 9,2%, hal tersebut membuktikan bahwa bakteri tidak mati secara keseluruhan, namun sekitar 91% bakteri terhambat pertumbuhan dan kolonisasinya, sehingga sesuai dengan persyaratan konsentrasi hambat minimal yaitu mampu menghambat 90% pertumbuhan bakteri dari total rata-rata bakteri yang tumbuh pada kontrol positif.^{13,20} Berdasarkan alasan inilah disimpulkan bahwa konsentrasi hambat minimal ekstrak buah delima merah (*Punica granatum linn*) terhadap bakteri *Enterococcus faecalis* adalah 25% dan konsentrasi bunuh minimal ekstrak buah delima merah (*Punica granatum linn*) terhadap bakteri *Enterococcus faecalis* adalah 50%. Hal ini sama dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan pada ekstrak buah delima merah yang memiliki daya antibakteri terhadap *Streptococcus viridans* pada konsentrasi 25%.⁹

Hasil penghitungan pertumbuhan koloni *Enterococcus faecalis* dalam media *blood agar* menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak buah delima merah maka akan semakin meningkat bahan aktif antibakteri yang terkandung dalam ekstrak buah delima merah (*Punica granatum linn*), sehingga jumlah koloni *Enterococcus faecalis* yang tumbuh semakin menurun. Hal ini sesuai dengan hipotesis bahwa dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak maka bakteri yang mengalami kematian semakin meningkat karena dengan meningkatnya karena bahan aktif antibakteri yang terkandung dalam ekstrak buah delima merah semakin banyak, selain itu kerusakan sel bakteri yang terjadi akibat bahan antibakteri tidak dapat diimbangi dengan kemampuan perbaikan dari sel bakteri, sehingga bakteri menjadi lisis.^{10,21,22,23}

Mekanisme penurunan pertumbuhan koloni bakteri hingga menyebabkan kematian dari bakteri tersebut disebabkan oleh sinergisme fungsi dari senyawa aktif yang terdapat dalam ekstrak buah delima merah. Senyawa aktif tersebut adalah flavonoid, tanin dan alkaloid.

Flavonoid bersifat sebagai koagulan protein sebagaimana sifat fenol.¹² Aktivitas antibakteri flavonoid dilakukan dengan merusak dinding sel yang terdiri atas lipid dan asam amino akan bereaksi dengan gugus alkohol pada senyawa flavonoid, membentuk kompleks dengan protein ekstraseluler terlarut dari dinding sel sehingga dinding sel akan rusak dan senyawa tersebut dapat masuk ke dalam inti sel.^{11,24,25} Terbentuknya senyawa kompleks dengan protein melalui ikatan hidrogen menyebabkan struktur tersier protein terganggu, dan protein

tidak dapat berfungsi lagi maka terjadi denaturasi protein dan asam nukleat.²⁶ Denaturasi tersebut menyebabkan koagulasi protein dan mengganggu metabolisme dan fungsi fisiologis bakteri. Metabolisme yang terganggu akan mengakibatkan rusaknya sel secara permanen karena tidak tercukupinya kebutuhan energi dan akhirnya menyebabkan sel bakteri lisis.²⁷

Tanin yang terkandung dalam buah delima merupakan basis aktivitas antibakterial dengan merusak membrane sel yang menyebabkan kebocoran intraselular.¹⁰ Kebocoran intrasel bakteri menyebabkan keluarnya komponen sel/organel sel seperti nukleus, mitokondria, lisosom, ribosom, badan golgi dan sebagainya. Organel sel tersebut berfungsi untuk menjalankan kehidupan sel bakteri dan mempertahankan fungsi normal kehidupan bakteri, apabila terganggu maka sel bakteri akan rusak dan bakteri menjadi lisis.^{12,23,28} Kemampuan tanin dalam fungsinya sebagai bahan antibakteri yaitu terletak pada kapasitas ikatannya dengan zat besi dan juga menghambat aktivitas *glucosyltransferase* dan adesi bakteri.²⁹ Tanin bekerja dengan cara membentuk senyawa kompleks terhadap protein ekstraseluler yang mengganggu integritas membran sel bakteri (*lipid bilayer*). Rusaknya membran sel dapat menyebabkan tegangan permukaan membran sel bakteri menurun sehingga dapat meningkatkan permeabilitas membran sel bakteri. Hal ini menyebabkan kebocoran molekul dan ion sehingga dapat menyebabkan kerusakan atau kematian sel.^{30,31}

Alkaloid memiliki aktivitas antibakteri dengan cara mengganggu peptidoglikan yang merupakan komponen penyusun dinding sel bakteri sehingga lapisan dinding sel mengalami gangguan dan tidak terbentuk secara utuh.¹²

Ekstrak buah delima merah (*Punica granatum linn*) memiliki kandungan yang potensial untuk dikembangkan sebagai bahan irigasi saluran akar. Buah delima merah mengandung senyawa tanin yang memiliki sifat "astringen" yang mampu menurunkan tegangan permukaan bahan irigasi sehingga kemampuan membasahi saluran akar menjadi optimal,¹² senyawa flavonoid yang bersifat anti alergi, dan anti inflamasi, senyawa alkaloid yang berfungsi sebagai bahan yang bersifat anti neoplastik yang dapat mengurangi peradangan pada saluran akar dan jaringan periapikal. Dari hasil penelitian ini, ekstrak buah delima merah mampu menghambat dan membunuh bakteri *Enterococcus faecalis* yang merupakan bakteriyang paling resisten pada saluran akar dan

merupakan salah satu penyebab dari kekambuhan penyakit post perawatan endodontik. Keseluruhan manfaat tersebut diatas diperlukan sebagai persyaratan bahan irigasi saluran akar yang ideal.

SIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) ekstrak buah delima merah terhadap bakteri *Enterococcus faecalis* adalah 25% dan Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM) ekstrak buah delima merah terhadap bakteri *Enterococcus faecalis* adalah 50%.

DAFTAR PUSTAKA

1. Mahmoudpour Ali, RahimiSaeed, SinaMahmood, et al. *Isolation and identification of Enterococcus Faecalis from Necrotic Root Canals Using Multiplex PCR*. Journal of Oral Science, 2007. 49(3).
2. Narayanan .L Lakshmi, C Vaishnavi. *Endodontic Microbiology*. J Consers Dent. 2010.13(4).
3. Chavez de Paz. *Gram-positive organism in endodontic infections..* Endodontic Topics. 2004.
4. Wang Qian-Qian, Cheng-Fei Zhang, Chun-Hung Chu, Xiao-Fei Zhu. *Prevalence of Enterococcus Faecalis in Saliva and Filled Root Canals of Teeth Associated with Apical Periodontitis*. International Journal of Oral Science. 2012.4.
5. Athanassiadis B, PV Abbott, LJ Walsh. *The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontics*. Australian Dental Journal Supplement. 2007.52(1).
6. Khan, Jahir Alam. Sonali Hanee. *Antibakteria Activity of Punica grantum Peels*. International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology. 2011. 2 (3).
7. Min, B. R., Pinchak, W. E., Merkel, R., Walker, S., Tomita, G. and Anderson, R. C. *Comparative antimicrobial activity of tannin extracts from perennial plants on mastitis pathogens*. Scientific Research and Essay. 2008.3(2).
8. Reiska, KumalaBakti. *DayaAntibakteriInfusumKulitBuahDelima (PunicaGratum L) terhadap Streptococcus ViridansSecaraIn Vitro*. FakultasKedokteran Gigi UniversitasAirlangga. Surabaya. 2011.
9. Soekanto, Pradopo S, Yulianti A. *DayaHambatEkstrakKulitBuahDelimaputih TerhadapPertumbuhan Streptococcus Mutans..* Dental Journal 2002. Vol. 35, No.3, pp. 95-98.
10. Firdaus Rizka. *DayaAntibakteriDelimaPutih terhadap Bakteri Enterococcus Faecalis*. 2011. FakultasKedokteran Gigi UniversitasAirlangga. Surabaya.
11. Smullen, J., Koutsou, G.A., Foster, H.A., Zumbe, A., Storey, D.M., *The Antibacterial Activity of Plant Extracts Containing Polyphenols against Streptococcus mutans*, Caries Res, 2007.41, pp: 342-9.
12. Farida, Juliantina, Dewa A.C. *Manfaat Sirih Merah Sebagai Agen Anti Bakterial Terhadap Bakteri Gram Positif dan Negatif*. J. Kedokteran dan Kesehatan Indonesia. 2010.
13. Forbes, A.B. *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*. 12th ed. St Louis: Mosby. 2007. pp: 270.
14. Stuart, Charles H., Schwartz, Scott A., Beeson, Thomas J., and Owatz, Christopher B. *Enterococcus faecalis: Its Role in Root Canal Treatment Failure and Current Concepts in Retreatment*. JOE. 2006. 32 (2).
15. Baumgartner JC, Falkler WA. *Bacteria in the Apical 5 mm of Infected Root Canals*. J Endod. 1991. 17.
16. Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T. *Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis*. Int Endod J. 1998. 31.
17. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U. *Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1998.
18. Hancock HH, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J. *Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North Am population*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2001. 91.
19. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. *Mechanisms involved in the resistance*

- of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *IntEndod J.* 2002. 35.
20. Brooks F, Geo. Jawetz, Melnick, and Adelberg's *Medical Microbiology*. 24thed. New York: McGraw hill Comp. 2007.233.
 21. Bagg, J., Mac Farlane, T. W., Poxton, I. R., Smith, A. J., *Essentials of Microbiology for Dental Students*, 2nded, Oxford University Press, Glasgow, 2006. pp: 115-6.
 22. Patil, Ravikumar., Makari H.K., Gurupathy H. *In Vitro Antimicrobial Activity of Ethanol Extract Of Thevetia peruviana*. *EJEAF Che.* 2007.6(9).
 23. Ariesdyanata, Camelia. *Perbedaan Daya Hambat Ekstrak Daun Sirih Hijau (Piper bettelynn) Dengan Daun Sirih Merah (Piper crocatum) Terhadap Staphylococcus Aureus*. *ADLN Journal*. 2008.
 24. Cowan, M.M. *Plant Products As Antimicrobial Agents. Clinical Microbiology Reviews*. 1999. 12(4).
 25. Fowler ZL, Baron CM, Panepinto JC, Koffas MA. *Melanization of flavonoids by fungal and bacterial laccases. Yeast*. 2011. 28, pp: 181–188.
 26. Cushnie, T.P.T.; Lamb, A.J. *Antimicrobial activity of flavonoids . Int. J. Antimicrob. Agents*, 2005. 26.
 27. Agustin, Dian W. *Perbedaan Khasiat Anti Bakteri Bahan Irigasi Saluran Akar Antara Hidrogen Peroxida dan Infusum Daun Sirih Merah 20% Terhadap Bakteri Mix*. *MKG* 2005. Vol.38(1).
 28. Katzung, B.G. *Basic and Clinical Pharmacology*. Farmakologi Dasar dan Klinik. Alih bahasa: Setio Harsono. Jakarta: Salemba Medika. 2001. pp:3-16.
 29. Akkiyama, H., Fujii, K. *Antibacterial Action Of Several Tannins against Staphylococcus aureus*. *J of Antimicrobial Chemotherapy*, 2001. 48.
 30. Cowan, M.M. *Plant Products As Antimicrobial Agents. Clinical Microbiology Reviews*. 1999. 12(4).
 31. Yamazaki, T., Inoue, M., Sasaki, N., *et al*, *In Vitro Inhibitory Effects of Tea Polyphenols on the Proliferation of Chlamydia trachomatis and Chlamydia pneumoniae*, *Jpn. J. Infect. Dis.* 2003. 56.